



DE 00/364

| |
|--------------------|
| REC'D 03 AVR. 2000 |
| WIPO |

Bescheinigung

Herr Professor Dr. Jörn Bullerdiek in Bremen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen"

am 4. Februar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole A 61 K, A 61 P und C 12 Q der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 22. März 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 04 514.3

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Dzierzon

BM3834

Zusammenfassung



Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen umfassend einen Impfstoff gegen ein Virus, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt.

5

BOEHMERT & BOEHMERT
ANWALTSSOZietät

Boehmert & Boehmert - P.O.B. 43 02 54 - D-80732 München

Deutsches Patent- und Markenamt
Zweibrückenstr. 12
80297 München

DR.-ING. KARL BOEHMERT, PA (1899-1973)
DIPL.-ING. ALBERT BOEHMERT, PA (1902-1993)
WILHELM J. H. STAHLBERG, RA, Bremen
DR.-ING. WALTER HOORMANN, PA*, Bremen
DIPL.-PHYS. DR. HEINZ GODDAR, PA*, München
DR.-ING. ROLAND LIESEGANG, PA*, München
WOLF-DIETER KUNTZE, RA, Bremen, Alicante
DIPL.-PHYS. ROBERT MÜNZHUBER, PA (1933-1992)
DR. LUDWIG KOUKER, RA, Bremen
DR. (CHEM.) ANDREAS WINKLER, PA*, Bremen
MICHAELA HUTH-DIERIG, RA, München
DIPL.-PHYS. DR. MARION TÖNHARDT, PA*, Düsseldorf
DR. ANDREAS EBERT-WEIDENFELLER, RA, Bremen
DIPL.-ING. EVA LIESEGANG, PA*, Berlin

PROF. DR. WILHELM NORDEMANN, RA, Brandenburg
DR. AXEL NORDEMANN, RA, Berlin
DR. JAN BERND NORDEMANN, LL.M., RA, Berlin
DIPL.-PHYS. EDUARD BAUMANN, PA*, Hohenkirchen
DR.-ING. GERALD KLOPSCH, PA*, Düsseldorf
DIPL.-ING. HANS W. GROENING, PA*, München
DIPL.-ING. SIEGFRIED SCHIRMER, PA*, Bielefeld
DR. ANKE SCHIERHOLZ, RA, Potsdam
DIPL.-ING. DR. JAN TÖNNIES, RA, Kiel
DIPL.-PHYS. CHRISTIAN BIEHL, PA*, Kiel
DIPL.-PHYS. DR. DOROTHÉE WEBER-BRULS, PA*, Frankfurt
DR.-ING. MATTHIAS PHILIPP, PA*, Bremen
DIPL.-PHYS. DR. STEFAN SCHOHE, PA*, München
MARTIN WIRTZ, RA, Bremen
DR. DETMAR SCHÄFER, RA, Bremen
DIPL.-CHEM. DR. ROLAND WEIS, PA, Düsseldorf
DIPL.-PHYS. DR.-ING. UWE MANASSE, PA, Bremen
DR. CHRISTIAN CZYCHOWSKI, RA, Berlin
CARL-RICHARD HAARMANN, RA, München
DIPL.-BIOL. DR. ARMIN K. BOHMANN, PA, München

PA - Patentanwalt Patent Attorney
RA - Rechtsanwalt Attorney at Law
* - European Patent Attorney
Alle zugelassen zur Vertretung vor dem Europäischen Markenamt, Alicante
Professional Representatives at the Community Trademark Office, Alicante

In Zusammenarbeit mit/in cooperation with
DIPL.-CHEM. DR. HANS ULRICH MAY, PA*, München

Ihr Zeichen
Your ref.

Ihr Schreiben
Your letter of

Unser Zeichen
Our ref.

München,

Neuanmeldung
(Patent)

BM3834

04. Februar 1999

Prof. Dr. Jörn Bullediek, Weißdornpfad 14, 28355 Bremen

Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen

1. Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen umfassend einen Impfstoff gegen ein Virus, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt.

2. Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen umfassend einen Impfstoff gegen ein Virus, dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei dieses Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate wechselwirkt.

- 17.75 -

Franz-Joseph-Straße 38 · D-80801 München · P.O.B. 43 02 54 · D-80732 München · Telefon +49-89-3840720 · Telefax +49-89-347010

MÜNCHEN · BREMEN · BERLIN · FRANKFURT · DÜSSELDORF · POTSDAM · BRANDENBURG · HOHENKIRCHEN · KIEL · BIELEFELD · ALICANTE

e-mail: postmaster@boehmert.boehmert.de

3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Impfstoff ein Viruspartikel oder Teile davon umfaßt.

4. Mittel nach Anspruch 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsstelle auf der Nukleinsäure des Virus das Struktur- und Sequenzmerkmal einer ersten AT-reichen Sequenz umfaßt.

5. Mittel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsstelle auf der Nukleinsäure des Virus neben der ersten Sequenz noch die Struktur- und Sequenzmerkmale umfaßt, daß

- eine zweite AT-reiche Sequenz vorhanden ist, und

- die erste und zweite Sequenz in einer räumlichen Distanz zueinander angeordnet sind.

6. Mittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die räumliche Distanz so ausgewählt ist, daß die erste Sequenz und die zweite Sequenz relativ zueinander in einer Ebene auf der Nukleinsäure angeordnet sind.

7. Mittel nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene der HMGI(Y)-Familie MAG-Gene, HMGIC, HMGIY, aberrante Transkripte von Genen der HMGI(Y)-Familie und Derivate davon umfassen.

8. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Impfstoff ein Antikörper ist, der gegen das Virus oder einen Teil davon gerichtet ist.

9. Mittel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe, die monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper, polyvalente Antikörper, Antikörperfragmente und Derivate davon umfaßt.

10. Mittel nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ausgewählt ist aus der Gruppe, die Polyoma-Viren umfaßt.

11. Mittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ausgewählt ist aus der Gruppe, die BK-Virus und JVC-Virus umfaßt.

12. Mittel nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß die Leiomyome solche des Uterus sind.

13. Verwendung des Mittels nach einem der Ansprüche 1-12 zur Prävention und/oder Behandlung von Endometriumpolypen.

14. Verwendung des Mittels nach einem der Ansprüche 1-12 zur Prävention und/oder Behandlung von Endometriose.

15. Verwendung des Mittels nach einem der Ansprüche 1-12 zur Immunisierung gegen die Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose verbunden sind.

16. Verwendung des Mittels nach einem der Ansprüche 1-12 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung umfassend das Mittel nach einem der Ansprüche 1-12 und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose oder zur Immunisierung gegen die Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose verbunden sind.

17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Immunisierung eine aktive Immunisierung ist.

18. Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose geeigneter Viren, wobei das Mittel einen Impfstoff gegen ein Virus umfaßt, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt, oder dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei das Genprodukt mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt, insbesondere ein Mittel nach einem der vorangehenden Ansprüche, welches die Schritte umfaßt:

- a) Transfektion einer Zellkultur mit normalem Karyotyp, die abgeleitet ist von einem Leiomyom, Endometriumpolypen oder Endometriosegewebe, mit einem Expressionsvektor für ein Gen der HMGI(Y)-Familie oder dessen Derivat,
- b) Vergleich des RNA-Musters der transfizierten Zellen mit demjenigen von Kontrollkulturen, und
- c) Überprüfen von in den transfizierten Kulturen gegenüber Kontrollkulturen exprimierten oder verstärkt exprimierten RNA(s) durch Sequenzhomologie auf das Vorhandensein viraler Elemente.

19. Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose geeigneter Viren, wobei das Mittel einen Impfstoff gegen ein Virus umfaßt, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt, oder dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei das Genprodukt mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren

Derivate umfaßt, insbesondere ein Mittel nach einem der vorangehenden Ansprüche, welches die Durchführung eines PCR-Tests umfaßt, wobei die für die PCR verwendeten Primer(paare) der Sequenz viraler Nukleinsäure entsprechen.

20. Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose geeigneter Viren, wobei das Mittel einen Impfstoff gegen ein Virus umfaßt, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivaten umfaßt, oder dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei das Genprodukt mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt, insbesondere ein Mittel nach einem der vorangehenden Ansprüche, welches die Schritte umfaßt:

- a) Anlegen einer cDNA-Bibliothek von einem Leiomyom, Endometriumpolypen oder endometriotischem Gewebe, das/der eine Aktivierung eines Gens der HGMI(Y)-Familie oder eines Derivates aufweist, und
- b) Screenen der cDNA-Bibliothek mit einer virusspezifischen Sonde oder
- c) Analyse der cDNA-Klone auf virale Sequenzen oder
- d) Vergleich mit einer cDNA-Bibliothek aus normalem Myometrium.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18-20, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen der HMGI(Y)-Familie ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGIC, HMGIY, MAG, aberrante Transkripte der Gene der HMGI(Y)-Familie und Derivate davon umfaßt.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18-21, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus, das virale Element oder die virusspezifische Sonde aus der Gruppe von Viren ausgewählt ist, die Polyoma-Viren umfaßt.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18-22, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierung, insbesondere im Rahmen des Screenings, unter Bedingungen niedriger Stringenz vorgenommen wird.

24. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 18-23 zum Ermitteln von Viren, wegen der zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose immunisiert werden kann.

25. Vorrichtung zur Bestimmung eines an der Pathogenese von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose beteiligten Virus, welche ein Genprodukt von Genen der HGMI(Y)-Familie oder einen Teil davon oder dessen Derivate umfaßt, das/der an einen Träger gebunden ist.

26. Vorrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ausgewählt ist aus der Gruppe von Materialien, die die für eine Bindung von Peptiden und/oder Proteinen geeigneten Materialien umfaßt.

27. Vorrichtung nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt oder ein Teil davon oder dessen Derivat zumindest jenen Teil umfaßt, der ein Binden von viraler Nukleinsäure an das Genprodukt erlaubt.

28. Vorrichtung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die virale Nukleinsäure zumindest das Struktur- und Sequenzmerkmal einer ersten AT-reichen Sequenz umfaßt.

29. Vorrichtung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die virale Nukleinsäure neben der ersten Sequenz noch die Struktur- und Sequenzmerkmale umfaßt, daß

- eine zweite AT-reiche Sequenz vorhanden ist und

- die erste Sequenz und zweite Sequenz in einer räumlichen Distanz zueinander angeordnet sind.

30. Vorrichtung nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die räumliche Distanz so ausgewählt ist, daß die erste Sequenz und die zweite Sequenz relativ zueinander in einer Ebene auf der Nukleinsäure angeordnet sind.

31. Vorrichtung nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder ein Teil davon oder dessen Derivat zumindest jenen Teil umfaßt, der ein Binden eines von einer viralen Nukleinsäure codierten Genproduktes erlaubt.

32. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 25-31 zur Bereitstellung einer für die Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose wesentlichen Komponente.

12

BOEHMERT & BOEHMERT
ANWALTSSOZietÄT

Boehmert & Boehmert - P.O.B. 43 02 54 - D-80732 München

Deutsches Patent- und Markenamt
Zweibrückenstr. 12

80297 München

DR.-ING. KARL BOEHMERT, PA (1899-1973)
DIPL.-ING. ALBERT BOEHMERT, PA (1902-1993)
WILHELM J. H. STAHLBERG, RA, Bremen
DR.-ING. WALTER HOORMANN, PA*, Bremen
DIPL.-PHYS. DR. HEINZ GODDAR, PA*, München
DR.-ING. ROLAND LIESEGANG, PA*, München
WOLF-DIETER KUNTZE, RA, Bremen, Alicante
DIPL.-PHYS. ROBERT MÜNZHUBER, PA (1933-1992)
DR. LUDWIG KOUKER, RA, Bremen
DR. (CHEM.) ANDREAS WINKLER, PA*, Bremen
MICHAELA HUTH-DIERIG, RA, München
DIPL.-PHYS. DR. MARION TÖNHARDT, PA*, Düsseldorf
DR. ANDREAS EBERT-WEIDENFELLER, RA, Bremen
DIPL.-ING. EVA LIESEGANG, PA*, Berlin

PA - Patentanwalt/Patent Attorney
RA - Rechtsanwalt/Attorney at Law
* - European Patent Attorney
Alle zugelassen zur Vertretung vor dem Europäischen Markenamt, Alicante
Professional Representation at the Community Trademark Office, Alicante

PROF. DR. WILHELM NORDEMANN, RA, Brandenburg
DR. AXEL NORDEMANN, RA, Berlin
DR. JAN BERND NORDEMANN, LL.M., RA, Berlin
DIPL.-PHYS. EDUARD BAUMANN, PA*, Höckelkirchen
DR.-ING. GERALD KLÖPSCH, PA*, Düsseldorf
DIPL.-ING. HANS W. GROENING, PA*, München
DIPL.-ING. SIEGFRIED SCHIRMER, PA*, Bielefeld
DR. ANKE SCHIERHOLZ, RA, Potsdam
DIPL.-ING. DR. JAN TÖNNIES, PA, RA, Kiel
DIPL.-PHYS. CHRISTIAN BIEHL, PA*, Kiel
DR.-PHYS. DR. DOROTHEE WEBER-BRULS, PA*, Frankfurt
DR.-ING. MATTHIAS PHILIPP, PA*, Bremen
DIPL.-PHYS. DR. STEFAN SCHOHE, PA*, München
MARTIN WIRTZ, RA, Bremen
DR. DETMAR SCHÄFER, RA, Bremen
DIPL.-CHEM. DR. ROLAND WEIB, PA, Düsseldorf
DIPL.-PHYS. DR.-ING. UWE MANASSE, PA, Bremen
DR. CHRISTIAN CZYCHOWSKI, RA, Berlin
CARL-RICHARD HAARMANN, RA, München
DIPL.-BIOL. DR. ARMIN K. BOHMANN, PA, München

In Zusammenarbeit mit/in cooperation with
DIPL.-CHEM. DR. HANS ULRICH MAY, PA*, München

Ihr Zeichen
Your ref.

Ihr Schreiben
Your letter of

Unser Zeichen
Our ref.

München,

Neuanmeldung
(Patent)

BM3834

04. Februar 1999

Prof. Dr. Jörn Bullerdiek, Weißdornpfad 14, 28355 Bremen

Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen

Die Erfindung betrifft Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Verwendungen desselben, Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung des Mittels wesentlicher Komponenten sowie eine Vorrichtung zur Bestimmung eines an der Pathogenese von Leiomyomen beteiligten Agens sowie dessen Verwendung.

Leiomyome des Uterus sind, selbst wenn sie gutartig ausgebildet sind, ein gesundheitspolitisches Problem. So haben Studien ergeben, daß in den westeuropäischen Staaten jede dritte Frau Uterusleiomyome aufweist und bspw. in den USA jeder fünfte Besuch beim Gynäkologen aufgrund von Myomen erfolgt (Morton, C.C.; Am. J. Pathol. 1998; 153(4): 1050-20).

- 17.75 -

Franz-Joseph-Straße 38 · D-80801 München · P.O.B. 43 02 54 · D-80732 München · Telefon +49-89-3840720 · Telefax +49-89-347010

MÜNCHEN · BREMEN · BERLIN · FRANKFURT · DÜSSELDORF · POTSDAM · BRANDENBURG · HÖHENKIRCHEN · KIEL · BIELEFELD · ALICANTE

e-mail: postmaster@boehmert.boehmert.de

Wenn diese Leiomyome sich symptomatisch äußern, kann dies z. B. mit erheblichen Blutungen und damit gesundheitlichen Risiken, Schmerzen und Harninkontinenz verbunden sein. Darüber hinaus können diese Leiomyome Infertilität bei den betroffenen Frauen zur Folge haben.

Derzeit steht keine kausale Myomtherapie zur Verfügung. Eine kausale Therapie fehlt auch für Endometriumpolypen und Endometriose. Derzeit stehen für die Myome zwei Therapieansätze zur Verfügung, zum einen die operative Entfernung der Gebärmutter (Hysterektomie), so alleine in den USA pro Jahr ca. 200.000 Hysterektomien (Morton, aaO), oder die Myomenukleation, d.h. das „Herausschälen“ der Tumoren, bei Uterus-Erhaltung. Im Falle der Myomenukleation kann präoperativ eine medikamentöse Myomverkleinerung herbeigeführt unter Verwendung von Hormon-Antagonisten, die jedoch insoweit mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden sind, als daß dadurch menopausale Beschwerden ausgelöst werden.

Es besteht somit für Leiomyome, insbesondere solche des Uterus, sowie Endometriumpolypen und Endometriose ein dringender Bedarf an präventiven Therapiekonzepten und den hierfür geeigneten Mitteln.

Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, insbesondere solchen des Uterus, sowie von Endometriumpolypen oder Endometriose bereitzustellen.

Weiterhin ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem jene wesentlichen Komponenten ermittelt werden können, die zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mittel geeignet bzw. erforderlich sind.

Schließlich ist es noch eine Aufgabe der Erfindung, eine Vorrichtung zur Bestimmung eines an der Pathogenese von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose beteiligten Agens sowie zur Bereitstellung einer für die Herstellung der erfindungsgemäßen Mittel wesentlichen Komponente zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch ein Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen umfassend einen Impfstoff gegen ein Virus, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch ein Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen umfassend einen Impfstoff gegen einen Virus, dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei dieses Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate wechselwirkt.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Endometriumpolypen.

Die Aufgabe wird auch gelöst durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Endometriose.

Schließlich wird die Aufgabe gelöst, indem das erfindungsgemäße Mittel verwendet wird zur Immunisierung gegen die Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie von Leiomyomen, Endometriumpolypen und/oder Endometriose verbunden sind.

Die Aufgabe wird des weiteren gelöst, indem das erfindungsgemäße Mittel zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung umfassend das erfindungsgemäße Mittel und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose oder zur Immunisierung gegen die Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose verbunden sind, verwendet wird.

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose geeigneter Viren, wobei das Mittel einen Impfstoff gegen ein Virus umfaßt, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von

Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt, oder dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei das Genprodukt mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt, insbesondere ein erfindungsgemäßes Mittel, welches die Schritte umfaßt:

- a) Transfektion einer Zellkultur mit normalem Karyotyp, die abgeleitet ist von einem Leiomyom, Endometriumpolypen oder Endometriosegewebe, mit einem Expressionsvektor für ein Gen der HMGI(Y)-Familie oder dessen Derivat,
- b) Vergleich des RNA-Musters der transfizierten Zellen mit demjenigen von Kontrollkulturen und,
- c) Überprüfen von in den transfizierten Kulturen gegenüber Kontrollkulturen exprimierten oder verstärkt exprimierten RNA(s) durch Sequenzhomologie auf das Vorhandensein viraler Elemente.

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose geeigneter Viren, wobei das Mittel einen Impfstoff gegen ein Virus umfaßt, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt, oder dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei das Genprodukt mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt, insbesondere ein erfindungsgemäßes Mittel, welches die Durchführung eines PCR-Tests umfaßt, wobei die für die PCR verwendeten Primer(paare) der Sequenz viraler Nukleinsäure entsprechen.

Schließlich wird in einem weiteren Aspekt die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose geeigneter Viren, wobei das Mittel einen Impfstoff gegen ein Virus umfaßt, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bin-

dungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie und deren Derivaten umfaßt, oder dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei das Genprodukt mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt, insbesondere ein erfindungsgemäßes Mittel, welches die Schritte umfaßt:

- a) Anlegen einer cDNA-Bibliothek von einem Leiomyom, Endometriumpolypen oder endometriotischem Gewebe, das/der eine Aktivierung eines Gens der HMGI(Y)-Familie oder eines Derivats aufweist, und
- b) Screenen der cDNA-Bibliothek mit einer virusspezifischen Sonde oder
- c) Analyse der cDNA-Klone auf virale Sequenzen oder
- d) Vergleich mit einer cDNA-Bibliothek aus normalem Myometrium.

Desweiteren wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch eine Vorrichtung zur Bestimmung eines an der Pathogenese von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose beteiligten Virus, welche ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder einen Teil davon oder dessen Derivate umfaßt, das/die an einen Träger gebunden ist.

Die Aufgabe wird auch gelöst durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Bereitstellung einer für die Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose wesentlichen Komponente.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß auch gelöst durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren zum Ermitteln von Viren, gegen die zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose immunisiert werden kann.

Bei den erfindungsgemäßen Mitteln zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomen, Endometriumpolypen oder Endometriose sowie bei dem Mittel zur aktiven Immunisierung gegen die Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie von Leiomyomen, Endometrium-

polypen oder Endometriose verbunden sind, ist in einer Ausführungsform vorgesehen, daß der Impfstoff ein Viruspartikel oder Teile von einem Viruspartikel umfaßt.

Weiterhin kann vorgesehen sein, daß die Bindungsstelle auf der Nukleinsäure des Virus das Struktur- und Sequenzmerkmal einer ersten AT-reichen Sequenz umfaßt.

Desweiteren kann vorgesehen sein, daß die Bindungsstelle auf der Nukleinsäure des Virus neben der ersten Sequenz noch die Struktur- und Sequenzmerkmale umfaßt, daß

- eine zweite AT-reiche Sequenz vorhanden ist, und

die erste und zweite Sequenz in einer räumlichen Distanz zueinander angeordnet sind.

Weiterhin schlägt die Erfindung vor, daß die räumliche Distanz so ausgewählt ist, daß die erste Sequenz und die zweite Sequenz relativ zueinander in einer Ebene auf der Nukleinsäure angeordnet sind.

Bei den erfindungsgemäßen Mittel ist vorgesehen, daß die Gene der HMGI(Y)-Familie MAG-Gene, HMGIC, HMGIY, aberrante Transkripte von Genen der HMGI(Y)-Familie und Derivate davon umfassen.

In einer alternativen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Mittel ist vorgesehen, daß der Impfstoff ein Antikörper ist, der gegen das Virus gerichtet ist.

Dabei kann vorgesehen sein, daß der Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe, die monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper, polyvalente Antikörper, Antikörperfragmente und Derivate davon umfaßt.

Bei den erfindungsgemäßen Mitteln kann in beiden Alternativen vorgesehen sein, daß das Virus ausgewählt ist aus der Gruppe, die Polyoma-Viren umfaßt.

118

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist dabei vorgesehen, daß das Virus ausgewählt ist aus der Gruppe, die BK-Virus und JVC-Virus umfaßt.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mittels kann weiterhin vorgesehen sein, daß die Leiomyome Uterusleiomyome sind.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose geeigneter Viren, wobei das Mittel einen Impfstoff gegen ein Virus umfaßt, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie und deren Derivate umfaßt, oder dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei das Genprodukt mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt, insbesondere ein erfindungsgemäßes Mittel, ist in einer Ausführungsform das Gen der HMGI(Y)-Familie ausgewählt aus der Gruppe, die HMGIC, HMGIY, MAG, aberrante Transkripte der Gene der HMGI(Y)-Familie und Derivate davon umfaßt.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren kann vorgesehen sein, daß das Virus, das virale Element oder die virusspezifische Sonde aus der Gruppe von Viren ausgewählt ist, die Polyomaviren umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren kann vorgesehen sein, daß die Hybridisierung, insbesondere im Rahmen des Screenings, unter Bedingungen niedriger Stringenz vorgenommen wird.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Bestimmung eines an der Pathogenese von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose beteiligten Virus, welche ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder einen Teil davon oder dessen Derivate umfaßt, sowie bei dessen Verwendung zur Bereitsstellung einer für die Herstellung eines erfindungsgemäßen Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometri-

umpolypen oder Endometriose wesentlichen Komponente, kann vorgesehen sein, daß der Träger ausgewählt ist aus der Gruppe von Materialien, die die für eine Bindung von Peptiden und/oder Proteinen geeigneten Materialien umfaßt.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann vorgesehen sein, daß das Genprodukt oder ein Teil davon oder dessen Derivat zumindest jenen Teil umfaßt, der ein Binden von viraler Nukleinsäure an das Genprodukt erlaubt.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann weiterhin vorgesehen sein, daß die virale Nukleinsäure zumindest das Struktur- und Sequenzmerkmal einer ersten AT-reichen Sequenz umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform kann dabei vorgesehen sein, daß die virale Nukleinsäure neben der ersten AT-reichen Sequenz noch die Struktur- und Sequenzmerkmale umfaßt, daß eine zweite AT-reiche Sequenz vorhanden ist und die erste Sequenz und die zweite Sequenz in einer räumlichen Distanz zueinander angeordnet sind.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist dabei vorgesehen, daß die räumlich Distanz so ausgewählt ist, daß die erste Sequenz und die zweite Sequenz relativ zueinander in einer Ebene auf der Nukleinsäure angeordnet sind.

In einer alternativen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist vorgesehen, daß das Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder ein Teil davon oder dessen Derivat zumindest jenen Teil umfaßt, der ein Binden eines von einer viralen Nukleinsäure codierten Genproduktes erlaubt.

Bei den erfindungsgemäßen Verwendungen der erfindungsgemäßen Mittel zur Immunisierung gegen die Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose verbunden sind, und zur Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann vorgesehen sein, daß die Immunisierung eine aktive Immunisierung ist.

Bevor im folgenden die Erfindung näher erläutert wird, sollen die hierin verwendeten Begrifflichkeiten in Ergänzung zu dem allgemeinen Verständnis des Fachmannes auf dem Gebiet definiert werden.

Unter Leiomyomen sollen hierin insbesondere benigne Tumoren der glatten Muskulatur verstanden werden (Definition nach Baltzer, J. et al.; Gynäkologie – Ein kurzgefaßtes Lehrbuch, 5. Aufl., 1994, Thieme Verlag).

Unter Endometriumpolypen sollen hierin insbesondere Hyperplasien und polypöse Wachstumsformen des Endometriums mit stromaler und Drüsen-(epithelialer) oder ausschließlich stromaler Komponente verstanden werden.

Unter Endometriose soll hierin insbesondere Endometriumherde, die sich an anderer Stelle als im Cavum uteri (Definition nach Baltzer aaO.) befinden, verstanden werden.

Unter Myomen sollen hierin insbesondere Leiomyome verstanden werden (Definition nach Baltzer aaO.).

Der Erfindung liegt die folgende überraschende Entdeckung zugrunde.

Trotz vielfältiger Bemühungen war die Ätiologie/Pathogenese von Uterusleiomyomen bisher unklar (Morton aaO.). Verschiedene mögliche Ursachen von Uterus-Leiomyomen werden bspw. von Cramer, S.F. et al. (Cramer S.F.; J. Reprod. Med. 1995, 40(8): 595-600) diskutiert, so bspw. Verletzung und Reperatur des Endometriums. Auch die Beteiligung von Östrogen und Östrogen-Rezeptoren bei der Entstehung von Neoplasmen der glatten Muskulatur des Uterus wurden in der Literatur diskutiert, so z. B. von Tiltman A.J. (Tiltman A.J.; Curr. Opin. Obstet. Gynecol., 1997; 9(1):48-51. Aufgrund von verschiedenen Untersuchungen hat sich jedoch die Vorstellung entwickelt, daß Mutationen der Gene der HMGI(Y)-Familie daran beteiligt sind (siehe Schoenmakers E.F. et al.; Nat. Genet. 1995, 10(4):436-44), wobei nach wie vor ungeklärt ist, ob es sich bei den besagten Mutationen um primäre oder sekundäre Ereignisse handelt.

Vollkommen unerwartet wurde durch die Erfinder festgestellt, daß die Pathogenese der Leiomyome eben nicht nur auf Mutationen, insbesondere Chromosomenaberrationen im Bereich der Loci von Mitgliedern der HMGI(Y)-Genfamilie, beruht, sondern es sich um eine Folge aus dem Zusammenwirken von Mutationsereignissen der Mitglieder der HMGI(Y)-Genfamilie und einem Virus, insbesondere eines schwach transformierenden Virus, bzw. Infektion mit einem solchen handelt, wobei die virale Infektion selbst bereits ausreicht, um eine Myomentstehung auszulösen, dessen Wachstumspotential durch eine - ggf. nachfolgende - Mutation von Genen der HMGI(Y)-Familie verstärkt wird.

Ohne im folgenden durch diese Annahmen beschränkt sein zu wollen, insbesondere nicht im Detail, scheint es derzeit so zu sein, daß infolge der Infektion mit einem schwach transformierenden Virus sowie dessen folgende Persistenz, mutmaßlich nach Integration in das zelluläre Genom, in Zellen ohne weitere Mutation von Genen der HMGI(Y)-Familie die transformierenden viralen Proteine nur schwach exprimiert werden und die resultierenden Tumoren daher sehr langsam wachsen und klein bleiben. Infolge einer mutationsbedingten Re-Aktivierung von Genen der HMGI(Y)-Familie, z. B. durch Verlagerung von Enhancern in Juxta-Position zu den Genen, kommt es zu einer verstärkten Aktivierung der Gene der transformierenden Proteine und einer insgesamt erhöhten Expression derselben. Die in der Zelle vermehrt vorhandenen transformierenden Proteine führen zu einer deutlich höheren Wachstumsaktivität der entsprechenden Tumoren und somit zu einem verstärkten Tumorwachstum.

Konkret hat man gefunden, daß die Genprodukte der Mitglieder der Gene der HMGI(Y)-Familie, die typischerweise an Nukleinsäuren binden können, so bspw. beschrieben von French, S.W. et al. (French, S.W. et al.; Mol. Cell Biol., 1996; 16(10): 5393-99; Yie, J. et al.; Mol. Cell Biol., 1997, 17(7): 3649-62), auch an Nukleinsäure von transformierenden Viren binden, wobei bei Bindung im Bereich der regulatorischen Regionen der Nukleinsäure (z.B. Promotoren und Enhancer) die Genprodukte der Gene der HMGI(Y)-Familie auf die Transkriptionsrate der viralen transformierenden Proteine Einfluß nehmen.

Weiterhin hat man gefunden, daß die Genprodukte der Mitglieder der Gene der HMGI(Y)-Familie auch mit einem Genprodukt einer viralen Nukleinsäure wechselwirken können.

Diese Wechselwirkung kann in einer direkten Wechselwirkung der beiden Genprodukte, d.h. dem Genprodukt der viralen Nukleinsäure und demjenigen eines Gens der HMGI(Y)-Familie, bestehen. Eine andere Form der Wechselwirkung kann darin bestehen, daß diese durch eine weitere Komponente vermittelt wird, d.h. keine direkte Wechselwirkung der beiden Genprodukt-Spezies vorliegt. Diese vermittelnde weitere Komponente kann bspw. eine Nukleinsäure sein, und insbesondere eine solche Nukleinsäure, die eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie aufweist, wie sie oben beschrieben wurde.

Infolge dieses Zusammenwirkens von Genprodukten der Gene der HMGI(Y)-Familie mit Nukleinsäure von transformierenden Viren, insbesondere den regulatorischen Regionen der Nukleinsäure (z.B. Promotoren und Enhancer) dieser Viren, kann der Entstehung von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose dadurch entgegengewirkt werden, daß ein Impfstoff gegen die entsprechenden Viren, d.h. solche Viren, deren Nukleinsäure zumindest eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivaten umfaßt, bereitgestellt wird, der verhindert, daß die entsprechenden Gewebe, d.h. das Myometrium und das Endometrium sowie andere mesenchymale Gewebe, viral infiziert werden und somit die Ausbildung des Komplexes aus viraler Nukleinsäure und Genprodukten der Gene der HMGI(Y)-Familie verhindert, was in der Folge dazu führt, daß die Ausbildung von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose unterbleibt.

Bei der Pathogenese von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose scheint weiterhin eine Bindung von Genprodukten viraler Nukleinsäure mit Genprodukten von Genen der HMGI(Y)-Familie und deren Derivaten zu erfolgen und infolge dessen sich der Einfluß der viralen transformierenden Proteine zu erhöhen. Auf der Grundlage dieses Zusammenwirkens können entsprechend Impfstoffe und damit die erfindungsgemäßen Mittel zur Verfügung gestellt werden, die gegen ein Virus gerichtet sind, welches die besagte Wechselwirkung zwi-

schen von seiner Nukleinsäure codiertem Protein einerseits und Genprodukten von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate andererseits umfaßt.

Hierin soll Bindung eines Genprodukts von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivaten an virale Nukleinsäure oder an das Genprodukt viraler Nukleinsäure, insbesondere eine jegliche Wechselwirkung der daran beteiligten Molekülspezies umfassen, die dazu führt, daß die den Komplex ausbildenden Komponenten nicht mehr als Einzelkomponenten wahrgenommen werden, sondern der Komplex die einzig wahrnehmbare Komponente ist. Eine derartige Bindung schließt bspw. Wechselwirkung durch elektrostatische Anziehungskräfte, van der Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindungen und Disulfidbrücken und Kombinationen davon ein. Ein derartiger Komplex umfaßt zumindest die beiden Genproduktespecies, d.h. ein Genprodukt der viralen Nukleinsäure und ein Genprodukt der Gene der HMGI(Y)-Familie, die direkt miteinander wechselwirken können, kann aber auch zusätzlich eine Nukleinsäure umfassen, wobei auch in diesem Fall eine direkte Wechselwirkung der beiden Genproduktespecies erfolgen kann, jedoch nicht notwendigerweise erfolgen muß.

Insoweit betrifft ein Aspekt der Erfindung auch einen Impfstoff gegen transformierende Viren, der zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, insbesondere des Uterus, sowie Endometriumpolypen und Endometriose geeignet ist.

Mit den erfindungsgemäßen Mitteln wird somit eine Prävention für und kausale Therapie von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose möglich und die bisherigen unbefriedigenden Therapiekonzepte mit ihren nicht unerheblichem Gefährdungspotential obsolet. Dabei ist besonders beachtlich, daß die Verwendung von Impfstoffen für den Körper besonders schonend, da mit in der Regel vergleichsweise weniger Nebenwirkungen verbunden, ist.

Die Herstellung von Impfstoffen gegen Viren ist in der Technik allgemein bekannt und bspw. beschrieben ist in Modrow, S.; Falke, D.; Molekulare Virologie, Spektrum, Akad. Verl., 1997.

Bei Impfstoffen sind grundsätzlich verschiedene Arten bekannt, nämlich Lebendimpfstoffe, die vermehrungsfähiges Virus enthalten, Impfstoffe aus inaktiviertem Virus, wo die Viren in nicht mehr vermehrungsfähiger Form vorliegen, Spaltimpfstoffe, die nur aus den für die Immunisierung wichtigen Komponenten des Virus bestehen, auch als Subunit-Vakzine oder Antigenimpfstoffe bezeichnet, und sogenannte „synthetische Antigenimpfstoffe“. Alle vorerwähnten Impfstoffformen können im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

Lebendimpfstoffe enthalten vermehrungsfähige Virusstämme, die einen spezifischen Schutz bewirken, aber bei gesunden Tieren zu keiner Erkrankung führen. Ein Lebendimpfstoff kann entweder aus homologen (artgleichen) oder heterologen (artfremden) Virusstämmen hergestellt werden. Als homologe Impfstoffe können natürlich gewonnene oder künstlich hergestellte Stämme eines Virus verwendet werden.

Natürlich gewonnene Impfvirusstämme stammen von Feldstämmen ab, die nur noch eine schwache bzw. keine Virulenz mehr besitzen, also bei gesunden Tieren keine Erkrankung mehr hervorrufen, sich aber im Wirt vermehren und die Ausbildung einer Immunität bewirken.

Eine Untergruppe der Lebendimpfstoffe betrifft die künstlich abgeschwächten, attenuierten Stämme. Sie werden aus gut immunisierenden, vollvirulenten Feldviren dadurch gewonnen, daß sie nach einer mehr oder weniger großen Anzahl von Passagen, bevorzugt in Zellkulturen, künstlich kultiviert werden, wodurch sie ihre Virulenz für den natürlichen Wirt verlieren. Der Virulenzverlust in einer derartigen passierten Viruspopulation tritt nicht gleichzeitig bei allen Viruspartikeln ein. Durch bestimmte Selektionsverfahren kann man aber attenuierte Viruspartikel isoliert gewinnen (z. B. Plaque-Methode, Endverdünnungsmethode usw.).

Unter Attenuierung versteht man eine gezielte Abschwächung oder Aufhebung der Virulenz eines vermehrungsfähigen Virus für einen bestimmten Wirt unter Erhaltung der Vermehrungsfähigkeit, der Antigenität und der Immunogenität, die über eine bestimmte Generationsfolge konstant bleibt.

Die Attenuierung kann eine Modifikation oder eine Mutation hinsichtlich Verlust der krankmachenden Eigenschaften, hier im vorliegenden Falle insbesondere hinsichtlich der transformierenden Eigenschaften, sein. Sie ist entsprechend mehr oder weniger stabil. Während man in früherer Zeit für eine künstliche Virulenzabschwächung vorwiegend Passagen in Tieren oder Bruteiern durchführte, gewinnt man heute attenuierte Stämme hauptsächlich aus Zellkulturen über Dauerpassagen.

Lebendvakzine aus heterologen Virusstämmen können dann einen Immunschutz bewirken, wenn zwischen artverschiedenen Viren sehr enge immunologische Verwandtschaftsbeziehungen bestehen. Man kann dann als Impfstamm den verwandten heterologen und deshalb nicht krankmachenden Virusstamm verwenden.

Lebendvakzine haben Vor- und Nachteile. Durchschnittlich wird mit ihnen eine bessere und länger anhaltende Immunität erzielt. Ein gut attenuiertes Impfvirus kann den Immunitätsmechanismus nur dann stimulieren, wenn es in ausreichender Konzentration verabreicht wird. Die Bestimmung einer entsprechenden ausreichenden Konzentration kann durch einfache routinemäßige Versuche erfolgen, die im Rahmen des Könnens des Durchschnittsfachmanns liegen. Der Impfschutz setzt in der Regel schon nach wenigen Tagen nach der Impfung ein. Verantwortlich sind hierfür mehrere Vorgänge: Interferenz, Interferon-Bildung, schnelle Entwicklung einer zellulären Immunität. Ein weiterer Vorteil von Lebendvakzinen besteht darin, daß sie sehr leicht lokal appliziert werden können, z. B. oral oder per Aerosol. Dies ist besonders mit Blick auf die vergleichsweise leichte Zugänglichkeit der betroffenen Gewebe bzw. Organe im Falle von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose vorteilhaft, da in einem solchen Fall der Endverbraucher ein entsprechendes Mittel selbst anwenden kann.

Weiterhin können gemäß der vorliegenden Erfindung Impfstoffe aus inaktivierten Viren verwendet werden. Als Virusinaktivierung wird generell die Aufhebung der Infektiosität eines Virusteilchens bezeichnet. In der Impfstoffherstellung speziell versteht man unter Inaktivierung, daß Viren künstlich, mit chemisch-physikalischen Verfahren, die Vermehrungsfähigkeit genommen wird, ohne daß dabei die anderen Aktivitäten, insbesondere die antigenen und

immunogenen Fähigkeit negativ beeinflusst werden. Für Impfstoffe aus inaktivierten Viren findet sich in der Literatur teilweise noch der Begriff „antigener Impfstoff“.

Als Ausgangsmaterial für diese Impfstoffe dienen aus virushaltigen Organen oder Geweben, heute jedoch in erster Linie aus Zellkulturen hergestellte, gereinigte und hochkonzentrierte Virussuspensionen von vollvirulenten gut immunisierenden Virusstämmen. Diese konzentrierten Virussuspensionen werden dann schonend durch geeignete Verfahren inaktiviert. Optimal sind chemische oder physikalische Behandlungen, die die Virusnukleinsäure als Träger der Vermehrungsfähigkeit und Infektiosität zerstören, jedoch die Proteinanteile des Virus, die wirksame Komponenten für Antigenität und Immunogenität sind, möglichst wenig schädigen, denaturieren oder verändern. Bewährte Mittel sind z. B. Formaldehyd und bestimmte Detergenzien. Als physikalische Komponenten verwendet man Wärme und Strahlen.

Weiterhin können im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Spaltimpfstoffe verwendet werden, die durch Aufspaltung von Viren gewonnene antigene und immunisierende Viruskomponenten in, in der Regel, gereinigter Form enthalten.

Bei den behüllten Viren sind dies die virusspezifischen Glycoproteide der lipidhaltigen Hüllen. Spezifische Antikörper gegen diese Antigene binden in vivo an die Glycoproteide des Virus, blockieren dadurch deren Haftungsfunktion an die Zellen und damit die Infektiosität.

Die immunisierenden Glycoproteide behüllter Viren kann man durch die chemische Aufspaltung der Virushülle (bestimmte lipidlösende Detergenzien) freisetzen. Das Virus verliert dadurch spontan und restlos seine infektiösen Eigenschaften und anschließend wird das gewünschte Glycoprotein von unerwünschten Komponenten wie Nukleoprotein, Kapsidenzym, Lipide etc. des aufgespaltenen Virusmaterials durch physikalisch-chemische Verfahren gereinigt, konzentriert und zum Impfstoff verarbeitet.

Bei unbehüllten, nackten Viren sind Spaltimpfstoffe aus den für die Immunisierung maßgeblichen Kapsidproteinen von den Fachleuten auf dem Gebiet entwickelbar.

27

Schließlich können auch synthetische antigene Impfstoffe verwendet werden, die mittels gentechnologischer Verfahren hergestellt werden. Über Isolierung und Identifizierung der maßgeblichen Gene des Virusgenoms kann beispielsweise das Kapsidprotein der entsprechenden Viren gentechnologisch produziert werden. Dabei ist es im Rahmen der Fähigkeiten des Fachmannes die entsprechende Nukleinsäure bzw. daraus resultierenden Proteine soweit zu verkürzen, daß lediglich die antigene Determinante bzw. das entsprechende Epitop als Impfstoffkomponente verbleibt. In diesem Sinne ist auch die erfindungsgemäße Vorrichtung zu verwenden. Die an das mit Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie versehene Trägermaterial gebundene virale Nukleinsäure kann, in der Regel nach Elution, dazu verwendet werden, zu bestimmen welches Virus, bzw. dessen Nukleinsäure, an der Ausbildung des für die Entstehung von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose verantwortlichen Komplexes aus viraler Nukleinsäure und Genprodukt eines Gens der HMGI(Y)-Familie beteiligt ist.

Nach dieser Identifizierung kann die erfindungsgemäße Vorrichtung aber auch für die Bereitstellung einer für die Herstellung eines erfindungsgemäßen Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, insbesondere des Uterus, Endometriumpolypen und Endometriose wesentliche Komponente verwendet werden. Dabei wird eine virale Nukleinsäure oder ein Pool viraler Nukleinsäuren zu der erfindungsgemäßen Vorrichtung gegeben, woraufhin diejenige virale Nukleinsäure an die Vorrichtung bzw. an das in dieser an ein Trägermaterial gebundene Genprodukt eines Gens der HMGI(Y)-Familie bindet, die mindestens eine Bindungsstelle für das Genprodukt eines Gens der HMGI(Y)-Familie aufweist. Nicht gebundene oder unspezifisch gebundene virale Nukleinsäure wird entfernt, beispielsweise durch Waschen des Trägermaterials mit einer geeigneten Waschlösung. Anschließend wird die spezifisch gebundene virale Nukleinsäure vom Trägermaterial eluiert. Die solchermaßen erhaltene Nukleinsäure kann dann verwendet werden, um einen viralen Bestandteil zu bilden, der in den erfindungsgemäßen Mitteln verwendet wird. Beispielsweise kann die virale Nukleinsäure in einen Expressionsvektor kloniert werden und das exprimierte virale Peptid oder Protein als Impfstoff verwendet werden. Alternativ kann beispielsweise das solchermaßen exprimierte virale Peptid oder Protein, möglicherweise nach weiteren Zwischenschritten, die den Fach-

leuten bekannt sind, zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden, die dann ihrerseits als Impfstoff in den erfindungsgemäßen Mitteln verwendet werden können. Im Zusammenhang damit ist das exprimierte virale Peptid oder Protein bzw. der dagegen gerichtete Antikörper die für die Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose wesentliche Komponente.

Gleiches gilt auch für den Fall der Bindung eines Genproduktes der viralen Nukleinsäure an ein Genprodukt eines Gens der HMGI(Y)-Familie. In diesem Fall werden anstelle der viralen Nukleinsäure die Genprodukte viraler Nukleinsäure, insbesondere Nukleinsäure von Kandidatenviren, d.h. solchen Viren, die mutmaßlich an der - kausalen - Entstehung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose beteiligt sind, hinzugegeben. Die nach spezifischer Bindung und anschließender Elution erhaltenen von viraler Nukleinsäure codierten Genprodukte können sodann direkt als Impfstoff verwendet werden oder weiteren Modifikation oder weiteren Bearbeitungsschritten unterworfen werden. Dabei kann auch vorgesehen sein, daß die Impfstoffe weiter gereinigt werden oder mit entsprechenden Adjuvanzen versetzt oder für die angestrebte Verwendung in geeigneter Weise behandelt oder zubereitet werden werden.

Den Impfstoffen kann man Adjuvanzen hinzusetzen, wie bspw. vollständiges oder unvollständiges Freundesches Adjuvans. Weitere Zusätze sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, welches einen Impfstoff gegen ein Virus umfaßt, wobei die Nukleinsäure des Virus mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie und deren Derivate umfaßt, kann ebenfalls zur Prävention und/oder Behandlung von folgenden Krankheiten bzw. Krankheitszuständen verwendet werden: Endometriumpolypen und Endometriose. Der Grund für diese mögliche Verwendung liegt darin begründet, daß die allen drei genannten Krankheiten oder Erkrankungszuständen zugrundeliegenden, oben beschriebenen Mechanismen vergleichbar sind.

Gleiches gilt für die Verwendung des ebenfalls offenbarten Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Leiomyomen, welches einen Impfstoff gegen einen Virus umfaßt, wobei die Nukleinsäure des Virus für ein Genprodukt codiert, wobei dieses Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate wechselwirkt, zur Prävention und/oder Behandlung von Endometriumpolypen und Endometriose.

Bei den erfindungsgemäßen Mitteln steht dabei die Prävention gegenüber der Behandlung im Vordergrund.

Allgemein können die erfindungsgemäßen Mittel als pharmazeutisches Präparat vorliegen, das neben einem Impfstoff gegen ein Virus, wobei die Nukleinsäure des Virus mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie und deren Derivate umfaßt, auch pharmazeutisch akzeptable Träger umfaßt, die den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind.

Die erfindungsgemäßen Mittel können neben dem vorstehend beispielhaft charakterisierten Impfstoff weitere Zusätze, die bspw. der Stabilisierung des Impfstoffes, der Konservierung, der Modifikation der Eigenschaften des Impfstoffes selbst dienen, sowie Stoffe, die die Eigenschaften der erfindungsgemäßen Mittel modifizieren, umfassen.

Mittel, die die Eigenschaften des Impfstoffes selbst modifizieren, können Adjuvanzen, wie bspw. unvollständiges oder vollständiges Freundesches Adjuvans, sein.

Die erfindungsgemäßen Mittel können weiterhin Komponenten aufweisen, die sie in eine für die jeweilige angestrebte Applikationsform bevorzugte Form überführen. So kann z. B. im Falle der Ausbildung der erfindungsgemäßen Mittel als Aerosole neben dem Impfstoff entsprechendes für die Aerosolbildung erforderliches Trägermaterial vorgesehen sein.

Das erfindungsgemäße Mittel kann bspw. in Form einer Lösung oder Emulsion zur intradermalen, intravenösen oder subkutanen Injektion vorliegen. Flüssige Lösungen der erfindungsgemäßen Mittel können auch in infundierbarer Form vorliegen.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Mittel in lyophilisierter Form vorliegen.

Darüberhinaus können die erfindungsgemäßen Mittel grundsätzlich in einer jeglichen pharmazeutisch geeigneten Form vorliegen, einschließlich, bspw., Tabletten, Dragees, Suppositorien, Gele, Pulver.

Der Impfstoff selbst kann ein vollständiges Viruspartikel sein, lebend oder attenuiert, ebenso wie inaktiviert oder Teile davon, wobei die Teile davon typischerweise die antigenen und immunologischen Eigenschaften des jeweiligen Virus tragen. Es kann dabei vorgesehen sein, daß der Impfstoff eine Vielzahl verschiedener Viruspartikel oder antigenen bzw. immunogen wirksamer Teile umfaßt. Die Viruspartikel sowie die Teile können selbst in modifizierter Form vorliegen. Derartige Modifikationen können ausgebildet sein durch, wie dies allgemein für Peptide, Proteine, die ggf. glycosyliert sind, bekannt ist.

Die Viruspartikel oder Teile davon können gentechnologisch hergestellt sein. Es ist nicht erforderlich, daß die Viruspartikel oder Teile davon mit den für die Entstehung der Leiomyome, Endometriumpolypen oder Endometriose verantwortlichen oder zumindest damit assoziierten Viren identisch ist. Entscheidend ist, daß die im Impfstoff verwendeten oder zu dessen Herstellung verwendeten Viren, einschließlich Teilen davon, geeignet sind, eine gegen das für die Erkrankung kausale Agens, d.h. Virus, gerichtete Immunantwort zu erzeugen und somit die transformierenden Eigenschaften des an der Pathogenese beteiligten Agens bzw. Virus zu verhindern.

Man hat gefunden, daß die Bindungsstelle auf der Nukleinsäure des Virus eine Reihe von Struktur- und Sequenzmerkmalen umfaßt. Grundsätzlich scheint für die Bindung von Genprodukten der HMGI(Y)-Familie, Teilen davon und deren Derivaten, das Vorhandensein einer - ersten - AT-reichen Sequenz von Bedeutung zu sein. Dabei ist AT-reiche Sequenz nicht so zu verstehen, daß dies eine ausschließliche Abfolge bestehend aus AT-Dimeren ausbildet. Vielmehr kann diese Sequenz eine beliebige Reihenfolge der beiden Basen umfassen, die durch einzelne oder mehrere Nukleotide unterbrochen sein kann. Neben diesem ersten Struk-

5/1

Struktur- und Sequenzmerkmal weisen die besagten Bindungsstellen der Genprodukte der HMGI(Y)-Familie noch eine zweite AT-reiche Sequenz auf, die ähnlich ausgebildet sein kann wie die erste AT-reiche Sequenz. Beide AT-reiche Sequenzen sind in einer räumlichen Distanz relativ zueinander angeordnet. Diese räumliche Distanz ergibt sich aus den räumlichen Abmessungen und damit aus der Sekundär- und Tertiärstruktur der HMGI(Y)-Proteine, d.h. der Genprodukte der Gene der HMGI(Y)-Familie. Infolge dieser Sekundär- und Tertiärstruktur ist für ein Binden des HMGI(Y)-Genproduktes erforderlich, daß die erste Sequenz und die zweite Sequenz relativ zueinander in einer Ebene auf der viralen Nukleinsäure angeordnet sind. Betrachtet man die DNA als dreidimensionales Modell, so liegen bei der vorgeschilderten Anordnung die als Bindungsstellen wirkenden AT-reichen Sequenzen auf der dem Betrachter jeweils zugewandten Seite. Diese Anordnung wird auch als „same face“ bezeichnet. Liegen diese drei Struktur- bzw. Sequenzmerkmale der viralen Nukleinsäure vor, kommt es zu einem besonders nachhaltigen Binden des Genprodukts an die virale Sequenz, insbesondere in regulatorischen Regionen der Nukleinsäure (z.B. Promotoren und Enhancer), da bevorzugt diese die besagten Struktur- und Sequenzmerkmale aufweist. Fehlt eines oder mehrere dieser Sequenz- bzw. Strukturmerkmale, wird die Bindung eines Genproduktes der Gene der HMGI(Y)-Familie nur schwach oder gar nicht erfolgen.

Betrachtet man umgekehrt die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der Genprodukte der Gene der HMGI(Y)-Familie, so existieren dort drei Bereiche, oder Domänen, die in einer definierten Entfernung voneinander angeordnet sind, die zu AT-reichen Sequenzen eine – hohe – Affinität aufweisen. Eine erfolgreiche Bindung an eine Nukleinsäure setzt somit voraus, daß die AT-reichen Sequenzen in einer hierzu korrespondierenden Entfernung angeordnet sind. Diese Entfernung resultiert aus der Ganghöhe der Nukleinsäure, die in der Regel ca. 10 Basenpaare beträgt, woraus resultiert, daß der Abstand der AT-reichen Sequenzen in der Regel 10 Basenpaare sowie ganzzahlige Vielfache bis zu ≤ 3 davon beträgt.

Gemäß der vorliegenden Erfindung sind solche Impfstoffe für die erfindungsgemäßen Mittel geeignet, die gegen ein Virus gerichtet sind, deren Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für mindestens ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate

32

aufweist. Gene der HMGI(Y)-Familie sind in der Technik gut bekannt. Die Gene der HMGI(Y)-Familie stellen eine Familie von Genen dar, die, unter anderem, HMGIC, HMGIY und MAG-Gene umfaßt. Beispielfhaft sei hierzu auf die internationale Patentanmeldung PCT/EP96/00716 und PCT/DE96/02494 beschrieben, deren Offenbarungsgehalt hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird. Beachtlich ist, daß die Bindungsstelle auf der viralen Nukleinsäure für ein beliebiges der vorstehend genannten Gene bzw. dessen Genprodukt geeignet ist. Hierin soll der Begriff Genprodukt auch Teile davon bezeichnen, solange diese Teile noch geeignet sind, eine virale Nukleinsäure zu binden. Gleichfalls soll der Begriff Genprodukt die jeweiligen Derivate des Genproduktes umfassen, die eine Modifikation aufweisen, wie sie üblicherweise für Peptide und Proteine vorgenommen werden kann, und bspw. Deletionen und Austausche der carboxyterminalen Abschnitte der Proteine umfaßt. Insbesondere umfaßt der Begriff Derivate der Gene der HMGI(Y)-Familie auch die in PCT/DE96/02494 beschriebenen aberranten Transkripte sowie deren Translationsprodukte, solange diese nach wie vor in der Lage sind, an die virale Nukleinsäure, insbesondere in regulatorischen Regionen der Nukleinsäure (z.B. Promotoren und Enhancer) derselben, zu binden. Die Charakterisierung derartiger aberranter Transkripte ist bspw. beschrieben von Kazmierczak, B. et al; Am. J. Pathol., 1998; 153(2):431-5 und deren Struktur bspw. von Schoenmakers, E. F. et al, aaO.

In einer alternativen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Mittel kann vorgesehen sein, daß der Impfstoff ein Antikörper ist, der gegen das Virus gerichtet ist. Es ist dabei ausreichend, wenn der Antikörper nicht primär gegen das Virus oder einen entsprechenden Teil davon gerichtet ist, sondern vermittels einer entsprechenden Kreuzreaktivität seine Wirkung erfüllt und entsprechend gewährleistet, daß es zu keiner Wechselwirkung zwischen der viralen Nukleinsäure mit dem Genprodukt der Gene der HMGI(Y)-Familie kommt. Dabei kann vorgesehen sein, daß der Antikörper gegen eine jede beliebige Komponente des Virus gerichtet ist, d.h. er kann gerichtet sein gegen bzw. wechselwirken mit Proteinen oder Proteinfragmenten des Viruskapsids, des gegebenenfalls vorhanden Glycopeptids oder aber auch mit der entsprechenden viralen Nukleinsäure bzw. Fragmenten davon.

Der Antikörper, wie er im Rahmen der Erfindung verwendet wird, kann sein ein monoklonaler Antikörper oder polyklonaler Antikörper. Der Begriff Antikörper kann hierin eine Mischung verschiedener monoklonaler Antikörper umfassen. Weiterhin soll hierin der Begriff Antikörper ein jegliches Peptid oder Protein umfassen, welches mindestens eine Antikörpereigenschaft aufweist, insbesondere an ein geeignetes Epitop bindet und dafür sorgt, daß der Komplex aus Antikörper plus Epitop bzw. Antigen in einer für die Pathogenese von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose nicht mehr zugängliche Form überführt wird bzw. aus dem Pathogeneseprozeß entfernt wird. Dies kann bspw. dadurch erfolgen, daß eine Wechselwirkung eines Genproduktes eines Gens der HMGI(Y)-Familie mit der viralen Nukleinsäure oder eine solche mit einem Genprodukt einer viralen Nukleinsäure (wobei das entsprechende Virus - kausal - an der Entstehung von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose beteiligt ist) letztenendes vermieden wird, wobei diese Verhinderung sowohl direkt als auch indirekt bedingt werden kann, indirekt bspw. durch Entfernen der entsprechenden Viren bzw. Virenpartikel. Der Begriff Antikörper schließt auch Antikörperfragmente und deren Derivate ein, so insbesondere (Fab)' oder F(ab)₂-Fragmente sowie Einzelketten-Antikörper und dgl. Derivate dieser Antikörper sind den Fachleuten ebenfalls bekannt und schließen insbesondere ein.

Das vorstehend Gesagte gilt sinngemäß auch für den Fall, daß ein Impfstoff gegen ein Virus vorgesehen ist, dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei dieses Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate wechselwirkt.

Die Viren, gegen die ein Impfstoff bzw. ein Antikörper in den erfindungsgemäßen Mittel enthalten ist, gehören bevorzugt zur Gruppe der Polyoma-Viren. Polyoma-Viren gehören zur Familie der Papovaviridae, zu denen auch die Papilloma-Viren und Simian Vacuolating Virus 40 (SV 40) gehören. Die Familie zeichnet sich durch extreme Hitzestabilität aus. Papovaviridae sind hüllenlose kubische DNA-Viren mit einem Durchmesser von 45 bis 55 nm, umfassend 72 Kapsomere sowie eine zyklische doppelsträngige DNA.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung des erfindungsgemäßen Mittels zur Immunisierung, und insbesondere aktiven Immunisierung, gegen die Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose verbunden sind, sind bevorzugt die Viren jene, die kausal mit der Pathogenese/Ätiologie von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose verbunden bzw. assoziiert sind.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren werden Zellkulturen verwendet, die abgeleitet sind von einem Leiomyom, Endometriumpolypen oder endometriotischem Gewebe. Die Herstellung derartiger Zellkulturen sind den Fachleuten bekannt und ist bspw. beschrieben in Stern, C. et al.; Geburtsh. u. Frauenheilk. 52 (1992), 767-772.

Unter normalem Karyotyp soll hierin verstanden werden der Chromosomensatz, wie er nach Anwendung routinemäßiger Techniken erhalten wird, sofern er bei einer Darstellung von ≥ 500 Banden pro haploidem Satz keine erkennbaren Anomalien insbesondere der Bereiche 12q14-15 und 6p21 aufweist.

Ein Expressionsvektor für ein Gen der HMGI(Y)-Familie zeichnet sich dadurch aus, daß er in seiner Gesamtheit zur Expression eines Gens der HMGI(Y)-Familie führt und damit zur Herstellung entsprechender Genprodukte. Typischerweise umfaßt ein derartiger Expressionsvektor einen Replikationsursprung, die für ein Genprodukt der HMGI(Y)-Genfamilie oder Fragment davon kodierende Nukleinsäure, und geeignete transkriptions- und translationsregulierende Sequenzen. Derartige Konstrukte sind in der Technik bekannt und bspw. beschrieben in Winnacker, E.-L.; From Genes to Clones; Weinheim; New York: VCH, 1987.

Prinzipiell ist ein jegliches Transfektionsverfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung anwendbar, welches zu einer Transfektion der entsprechenden Zellkulturen führt.

Die Herstellung von cDNA ist den Fachleuten bekannt. Für den Vergleich des RNA- bzw. cDNA-Musters der transfizierten Zellen bzw. Kulturen mit demjenigen von nicht-transfizierten Zellen bzw. Kulturen wird typischerweise so vorgegangen, wie unter der Me-

thode des sogenannten „differential display“ verstanden (Diatchenko, L.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, S. 6025-6030, 1996).

Bei der Überprüfung von in den transfizierten Kulturen gegenüber Kontrollkulturen exprimierten oder verstärkt exprimierten RNA(s) durch Sequenzhomologie auf das Vorhandensein viraler Elemente wird typischerweise so vorgegangen, daß die Sequenz unter Zuhilfenahme von einschlägigen Datenbanken, z.B. BLAST, ein Datenbankservice des National Center for Biotechnology Information (NCBI), überprüft bzw. gegebenenfalls identifiziert werden.

Es ist im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens, daß auch von den primären Transkriptionsprodukten abgeleitete Nukleinsäuren für den Vergleich des RNA-Musters der transfizierten Kulturen mit demjenigen von Kontrollkulturen herangezogen werden können. Entsprechend ist es möglich, diesen Vergleich auf der Grundlage des cDNA-Musters anzustellen, wobei die cDNA von den Transkriptionsprodukten, d.h. den RNA-Spezies, hergestellt wurde unter Verwendung von bekannten Verfahren.

Die Kontrollkulturen sind in der Regel jene mit normalem Karyotyp, die abgeleitet sind von einem Leiomyom, Endometriumpolypen oder Endometriosegewebe, und welche mit einem Expressionsvektor transfiziert sind, dem jedoch das Gen der HMGI(Y)-Familie oder dessen Derivat, d.h. das für ein Genprodukt codierende Insert, fehlt. Kontrollkulturen können aber auch solche sein, die mit keinerlei Expressionsvektor transfiziert sind.

Bei einem weiteren erfindungsgemäßen Verfahren, bei dem die Durchführung eines PCR-Tests vorgesehen ist, wobei die für die PCR-verwendete Sonde eine virale Sonde ist, erfolgt der PCR-Test nach den in der Technik bekannten Verfahren. Unter PCR-Test wird ein Polymerase-Kettenreaktions-Test verstanden, bei dem mindestens ein sequenzspezifischer Primer zur selektiven Amplifikation der gesuchten Nukleinsäure(fragmente) verwendet wird. (siehe Newton, C.R.; Graham, A.; „PCR“; 1994, Spektrum Akadem. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Unter Primer oder viraler Sonde sollen hierin Oligonukleotide und/oder Nukleinsäurefragmente verstanden werden, die gerichtet sind auf eine Detektion von Nukleinsäuren, die eine Homologie zu dem Primer/der Sonde aufweisen. Die Herstellung derartiger viraler Sonden kann auf all den Fachleuten bekannte Wegen erfolgen, so bspw. durch organische chemische Synthese oder unter Verwendung von PCR oder Klonierungstechniken.

Wird im Rahmen eines erfindungsgemäßen Verfahrens eine cDNA-Bibliothek von einem Leiomyom, Endometriumpolypen oder Endometriosegewebe angelegt, das/der eine Aktivierung eines Gens der HMGI(Y)-Familie oder eines Derivates aufweist, so kann die Aktivierung durch eine entsprechende Chromosomenaberration kenntlich sein.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren wird das Screenen typischerweise unter Bedingungen niedriger Stringenz vorgenommen. Unter Bedingungen niedriger Stringenz soll dabei verstanden werden, daß durch Herabsetzen bspw. der Hybridisierungstemperatur oder Modifikation der Waschbedingungen (z.B. Erhöhung der Salzkonzentration) auch eine Bindung an solche Nukleinsäuren erfolgt, deren Homologie zu der Sequenz der Sonde deutlich reduziert ist, wobei zunächst auch eine Erfassung falsch-positiver Nukleinsäuresequenzen in Kauf genommen wird, da eine letztendliche Klärung ob es sich um ein positives Signal bzw. Ergebnis handelt, durch Sequenzierung und Sequenzanalyse der identifizierten Sequenzen erfolgt und somit eine Ausscheidung der falsch-positiven Sequenzen zuläßt.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren kann, nachdem durch einen Vergleich des RNA – oder cDNA – Musters von transfizierten Zellkulturen mit dem von Kontrollkulturen, oder durch ein positives Signal in einem PCR-Test unter Verwendung von Primer(paaren), die Sequenzen viraler Nukleinsäuren entsprechen, oder durch ein positives Signal beim Screenen einer cDNA-Bibliothek mit einer virusspezifischen Sonde, oder durch Analyse der cDNA-Klone auf virale Sequenzen oder Vergleich mit einer cDNA-Bibliothek aus normalem Myometrium, festgestellt wurde, daß virale Elemente in den Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriosegewebe bzw. den davon abgebildeten Zellkulturen vorhanden sind, weiterhin vor-

gesehen sein, daß die viralen Elemente identifiziert und/oder klassifiziert und ausschließlich für die Impfstoffherstellung verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Bestimmung eines an der Pathogenese von Leiomyomen, Endometriumpolypen oder Endometriose beteiligten Virus umfaßt ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie, das an einen Träger gebunden ist. Im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung sowie deren möglichen Verwendungen umfaßt der Begriff Genprodukt auch Teile der Genprodukte oder Derivate der Genprodukte. Dabei liegt der Definition von Genprodukten auch die oben gegebene Definition von Genen der HMGI(Y)-Familie zugrunde.

Das Genprodukt ist dabei an ein Trägermaterial gekoppelt, das vom Fachmann auf dem Gebiet entsprechend ausgewählt wird. Als Trägermaterialien eignen sich all jene Materialien, die eine Bindung von Proteinen oder Derivaten, sei es direkt oder indirekt erlauben. Geeignete Trägermaterialien finden sich typischerweise im Bereich der Chromatographiematerialien. Eine derartige Bindung kann auch eine Adsorption sein bzw. eine reversible Bindung. Da es sich bei den Genprodukten der HMGI(Y)-Familie um Proteine handelt, können die zur Immobilisierung von Proteinen verwendeten Verfahren und Verbindungen verwendet werden.

Hinsichtlich der Gestaltung der an das Trägermaterial gebundenen Genprodukte ist im wesentlichen darauf zu achten, daß derjenige Bereich an das Trägermaterial gebunden ist bzw. für die Bindung viraler Nukleinsäure zur Verfügung steht, der für das Binden an die virale Nukleinsäure verantwortlich ist. Insoweit kann das entsprechende Genprodukt verkürzt sein oder bspw. als Fusionsprotein zur Verfügung gestellt werden. Ein jegliches Konstrukt ist dabei denkbar, sofern der Nukleinsäure-bindende Teil des Genproduktes oder derjenige Teil des Genproduktes der Gene der HMGI(Y)-Familie, der für das Binden des Genproduktes der viralen Nukleinsäure verantwortlich ist, noch für eine Bindung einer Nukleinsäure zur Verfügung steht.

Im konkreten Fall kann eine derartige Vorrichtung so ausgebildet sein, daß es sich dabei um eine affinitätschromatographische Säule handelt, wobei an das Säulenmaterial entsprechend Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie, sei es nun von einem Genprodukt oder verschiedenen Genprodukten, immobilisiert ist und verschiedenen Ansätze oder auch Gemische von viraler Nukleinsäure oder von von viraler Nukleinsäure codiertem Genprodukt zur Trägermatrix hinzugegeben werden. Infolge der Wechselwirkung zwischen dem Genprodukt und der viralen Nukleinsäure bzw. dem Genprodukt der viralen Nukleinsäure kommt es zur Ausbildung eines stabilen Komplexes. Nicht spezifisch gebundene virale Nukleinsäure oder ungebundene Nukleinsäure bzw. nicht spezifisch gebundenes oder ungebundenes Genprodukt von viraler Nukleinsäure sowie weitere Bestandteile der aufgetragenen Probe werden von der Säule gewaschen. Durch einen geeigneten Elutionspuffer werden sodann – ggf. spezifisch – die Wechselwirkungen zwischen dem Genprodukt und der an das Genprodukt gebundenen viralen Nukleinsäure bzw. dem gebundenen Genprodukt der viralen Nukleinsäure verringert, so daß die entsprechenden viralen Nukleinsäuren oder die von diesen codierten Genprodukte eluiert und weiter analysiert werden können.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele, experimentellen Befunde und Figuren weiter erläutert. Dabei zeigt

Fig. 1 die Größenverteilung der Myome mit normalem Karyotyp (graue Säulen) sowie mit 12q14-15-Aberrationen (schwarze Säulen) und

Fig. 2 eine Übersicht der in Beispiel 4 verwendeten Vektoren

Beispiel 1

Die Ergebnisse bisheriger zytogenetischer Studien an Uterus-Myomen sind widersprüchlich bezüglich möglicher Korrelationen zwischen der Tumorgroße und dem Auftreten klonaler Chromosomenaberrationen. Das Problem dieser Studien ist allerdings, daß die untersuchten Tumoren möglicherweise z. B. nach Größe selektiert sind. Da die Frage einer möglichen Kor-

relation aber auch damit zusammen hängt, ob die Chromosomenaberrationen sekundär auftreten und das Wachstumspotential der betroffenen Tumoren verstärken, wurde eine Studie an unselektierten Myomen durchgeführt. Untersucht wurden dabei nur Myome nach Hysterektomie, wobei alle Tumoren untersucht wurden, die durch Tastuntersuchung des operativ entfernten Uterus nachweisbar waren.

Insgesamt wurden 155 Myome von 96 Patientinnen zytogenetisch untersucht. Dabei zeigten 28% der Myome klonale Karyotypänderungen. Auf die drei Hauptkaryotypengruppen mit normalem Karyotyp, Aberrationen der Chromosomenregion 12q14-15 und Deletion des langen Arms von Chromosom 7 entfielen 72%, 12% und 8%. Die durchschnittliche Tumorgroße für die Gruppen ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Durchschnittliche Myom-Größe in den drei Hauptkaryotyp-Gruppen mit 12q14-15-Aberrationen, Deletionen des langen Arms von Chromosomen 7 und normalem Karyotyp

| Karyotyp-Gruppe | durchschnittliche Größe [cm] \pm Standardabweichung[cm] |
|---------------------------|---|
| normaler Karyotyp | 3,4 \pm 2,1 |
| 12q14-15 Aberrationen | 8,9 \pm 5,6 |
| Deletion des Chromosoms 7 | 3,5 \pm 2,0 |

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß das Auftreten von 12q14-15-Aberrationen, die molekulargenetisch mit Mutationen im oder im Bereich des HMGIC-Gens korrelieren, mit einer hochsignifikanten Größenzunahme der entsprechenden Myome einhergehen, wenn man sie entweder mit Myomen mit normalem Karyotyp oder mit Deletionen am langen Arm von Chromosom 7 vergleicht. Die Unterschiede werden nicht nur beim Vergleich der Mittelwerte, sondern auch der Verteilungen der Tumorgößen der einzelnen Tumorguppen, wie dargestellt in Fig.1, deutlich.

Zusammengefaßt führt offenkundig das Auftreten von Chromosomenaberrationen der Chromosomenregion 12q14-15, das mit der verstärkten Expression von HMGIC-Gen oder der Expression veränderter Transkripte dieses Gens einhergeht, zu einem verstärkten Tumorstadium.

Beispiel 2

Mutationen im Bereich des HMGIC- oder HMGIY-Gens manifestieren sich zytogenetisch durch Chromosomenaberrationen der Region 12q14-15 bzw. 6p21. Zumindest theoretisch ist aber durchaus denkbar, daß die zytogenetisch erkennbaren Aberrationen nur „die Spitze des Eisberges“ darstellen und ein wesentlich größerer Teil der Mutationen der beiden genannten Gene mit zytogenetisch nicht darstellbaren chromosomalen Umbauten einhergeht. Wäre dies der Fall, könnte es für eine Schlüsselrolle der genannten Aberrationen bei der Tumorentwicklung insgesamt im Sinne einer primären Mutation sprechen. Eine Methode zum Nachweis der „versteckten“ Umlagerungen ist die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Es wurde an einer Serie von 40 Myomen mit anscheinend normalem Karyotyp FISH-Experimente durchgeführt, für die Cosmid- und PAC-Sonden eingesetzt wurden, die den Lokalisierungsort von HMGIC- bzw. HMGIY-Gen abdecken. Die Sonden wurden dabei so gewählt, daß ein Bereich von ca. 150 kb 5' bis 40 kb 3' vom HMGIC-Gen und von 30 kb 5' bis 40 kb 3' vom HMGIY-Gen abgedeckt wurde. Alle Myome wurden mit den Sonden für beide Genen untersucht; analysiert wurden jeweils mindestens 20 Metaphasen. In keinem Fall ergaben sich Hinweise auf mit Mitteln der konventionellen Zytogenetik nicht erkennbare, verdeckte chromosomale Umlagerungen der untersuchten Bereiche.

Berücksichtigt man die Häufigkeit der Myome ohne erkennbare zytogenetische Veränderungen (s. Beispiel 1) und die Ergebnisse der in diesem Beispiel dargestellten Untersuchungen, ist es wahrscheinlich, daß die Mutationen der Gene der HMGI(Y)-Familie bei der Mehrzahl der Uterus-Myome keine Schlüsselrolle spielt.

Beispiel 3

Unabhängig davon, ob diese Veränderungen primär oder sekundär sind, wird als molekular-genetische Basis der 12q14-15- und 6p21-Aberrationen bei Uterus-Myomen angenommen, daß es durch die chromosomalen Umlagerungen zu einer Expression/verstärkten Expression oder einer Expression aberranter Transkripte des HMGIC-Gens bzw. HGM1Y-Gens kommt, die in normalem Uterus-Gewebe fehlt. Für das HMGIC-Gen ist mittels einer RT-PCR in normalem Uterus-Gewebe im Regelfall keine HMGIC-Genexpression nachweisbar. Es wurden mit dieser Methode 40 Myomgewebe mit anscheinend normalem Karyotyp untersucht. Ziel der Untersuchung war wiederum festzustellen, ob bei diesen Myomen, wie bei solchen mit 12q14-15-Veränderungen, Hinweise auf eine HMGIC-Genexpression zu finden seien.

Bei keinem dieser Myome waren Hinweise auf eine Expression zu finden, so daß auch aus diesen Ergebnissen darauf geschlossen werden kann, daß bei der Entstehung dieser Myome HMGIC-Genexpression nicht das primäre Ereignis ist.

Beispiel 4

Für die Untersuchung der Wirkung von HMGIC auf den SV 40-Promotor werden zwei Vektorsysteme in eine Zelle transfektiert. Dies sind der Expressionsvektor H_3H_x für HMGIC und der „pGL3 Luciferase Reporter Vektor“ der Firma Promega. Das komplette „pGL3 Luciferase Reporter Vektor“-System von Promega umfaßt 4 verschiedene Vektoren, die es ermöglichen, DNA-Abschnitte hinsichtlich Promotor- oder Enhancer-Regionen zu untersuchen. Diese Vektoren sind in Fig. 2 dargestellt. Für die Untersuchung von Promotor-Abschnitten wird der Vektor „pGL3-Enhancer“ benötigt. Der Vektor „pGL3-Promotor“ ist für die Untersuchung von Enhancer-Elementen vorgesehen. Desweiteren wird der Vektor „pGL3-Promotor“ bei diesem Versuch verwendet, um die Wirkungsweise von HMGIC auf einen SV40-Promotor bzw. Promotoren anderer Polyomaviren zu testen. Hierzu wird der Vektor H_3H_x mit dem Vektor „pGL3-Promotor“ kotransfektiert.

42:

Der Vektor „pGL3-Control“ dient als Positivkontrolle für das System, eine Transfektion ausschließlich mit dem Vektor „pGL3-Promotor“ als Negativkontrolle.

Die einzelnen Vektoren haben abgesehen von Promotor- und Enhancer-Elementen die gleiche Grundstruktur. Sie verfügen über eine modifizierte Kodierungsregion für Feuerfliegen-Luciferase (*Photinus pyralis*) (*luc+*), welche für die Untersuchung der Transkriptionsaktivität in transfektierten eukaryotischen Zellen gewählt wurde. Desweiteren enthalten sie einen prokaryotischen Replikationsursprung zur Vermehrung in *E.coli*, ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion, einen Replikationsursprung von filamentösen Phagen (*f1 ori*) für die Produktion einzelsträngiger DNA (ssDNA) und eine „multi cloning site“ (MCS) 3' und 5' des Luciferase-Gens.

Der „pGL3-Promotor“-Vektor ist 5010 Basenpaare groß und enthält im Gegensatz zum „pGL3-Enhancer“ einen SV40-Promotor und keinen Enhancer. DNA-Fragmente, die vermeintliche Enhancer-Sequenzen enthalten, können 3' oder 5' des Luciferase-Gens eingesetzt werden und so zu einer Verstärkung führen. Desweiteren kann der SV40-Promotor durch andere Polyomavirus-Promotoren ersetzt werden.

Der Vektor „pGL3-Control“ (5256 Basenpaare) enthält einen SV40 Promotor und eine Enhancer-Sequenz, was in den meisten Säugerzellen zu einer starken Expression von *luc+* führt. Dieser Vektor dient zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und setzt den internen Standard für die Promotor- und Enhancer-Aktivität der anderen Vektoren.

Für die Untersuchung haben HeLa-Zellen als geeignet erwiesen, da sie sehr leicht zu handhaben sind, den Vorgang der Transfektion nahezu ohne Schaden überstehen und keine Expression von HMGIC aufweisen (das Nichtvorhandensein der HMGIC Expression wurde durch „Northern Blot“ nachgewiesen). Die Zellen werden für die Transfektion in Platten mit 6 Näpfen herangezogen.

Für den Vorgang der Transfektion wurden 2µg DNA mit Zellmedium (TC 199), ohne Kälberserum und Antibiotika, gemischt (beides kann die Komplexbildung stören), Endvolumen 100µl.

Zu dem DNA-Gemisch werden 10µl „SuperFect“ zugegeben. Nach dem Mischen inkubiert man 10 min bei Raumtemperatur, wobei sich Komplexe aus der DNA und dem „SuperFect“ bilden.

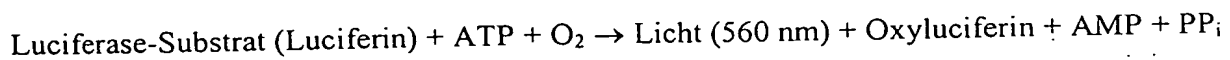
Während der Inkubation wird von den Zellen das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gespült. Das Gemisch aus „SuperFect“ und DNA wird mit 800µl Zellmedium mit 20% Kälberserum gemischt, welches anschließend auf die Zellen gegeben wird. Nach einer Inkubation (im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂) von 16-18 Stunden wird frisches Medium (20%) zugegeben und weitere 8-32 Stunden inkubiert.

Die Auswertung des Versuches erfolgt mit dem „Luciferase Assay Kit“ von Stratagene (s.u.).

Luciferase-Extraktion und Bestimmung der Luciferase-Konzentration:

Nach der Inkubation der transfektierten Zellen wird das Medium abgesaugt und 500µl 1x Zellysepuffer zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation, bei Raumtemperatur auf einem Schüttler, lysieren die Zellen. Das Zelllysate wird in Eppendorf-Cups überführt. Dieses ist für kurze Zeit bei 4°C lagerbar. Über längere Zeit kann es bei -80°C gelagert werden, hierbei geht jedoch bis zu 50% der Luciferase-Aktivität verloren.

Für die Bestimmung der Luciferasekonzentration werden 20µl Zelllysate mit 100µl „Luciferase assay reagent“ (LSA) (beides sollte Raumtemperatur haben) gemischt. Das Luciferin im Reaktionsgemisch wird unter ATP Verbrauch umgesetzt, wobei Lichtquanten entstehen.



Die emittierten Lichtquanten können mit einer Photozelle eines Luminometers gemessen werden. Die ermittelten Werte werden in relativen Lichteinheiten (relative light units (RLU)) angegeben und vermitteln im Verhältnis zu anderen Werten Auskunft über die gebildete Menge an Luciferase.

Ergebnisse:

Bisher wurden zwei voneinander getrennte Meßreihen durchgeführt. Weitere Messungen, vor allen Dingen mit Promotorregionen der BK- und JCV-Viren können leicht vorgenommen werden, im vorliegenden Testsystem durch Klonierung der entsprechenden Promotorregionen in die Testvektoren.

Die Ergebnisse der ersten 2 Meßreihen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tab. 2: Ergebnisse der Transfektionsversuch

| | Positiv- kontrolle | Negativ- kontrolle | 1µg H ₃ H _x (1µg pGL3-P) | 0,5.µg H ₃ H _x (1µg pGL3-P) | 0,25µg H ₃ H _x (1µg pGL3-P) |
|--|-----------------------|-----------------------|---|--|--|
| relative Licht- einheiten 1. Versuch | 14.500 | 1.800 | 4.300 | 8.800 | 3.800 |
| relative Lichteinheiten 2. Versuch | 15.100 | 2.100 | 5.100 | 9.400 | 4.800 |

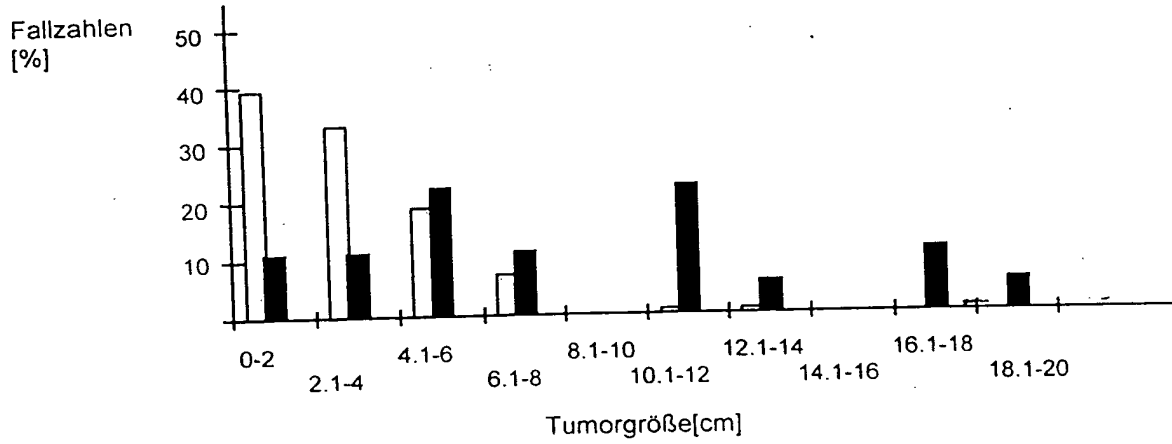
Die Meßergebnisse liegen über denen der Negativkontrolle und unter denen der Positivkontrolle mit sehr starkem Promotor, was deutlich eine leichte Regulierung der virale Promotorregion durch HMGIC belegt.

Dies belegt die vorstehend beschriebene Beteiligung von Viren an der Entstehung von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose.

Die in der vorstehenden Beschreibung sowie in den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein. Der Offenbarungsgehalt der Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

04.02.99

46.



F I G . 1

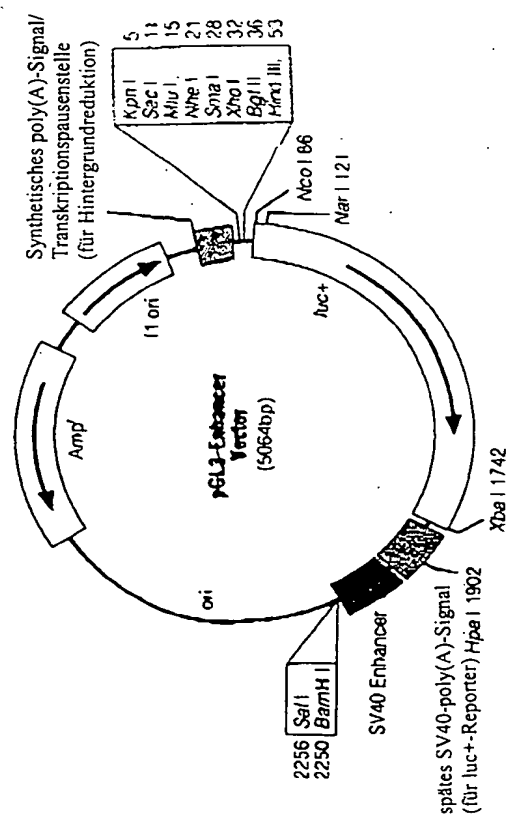
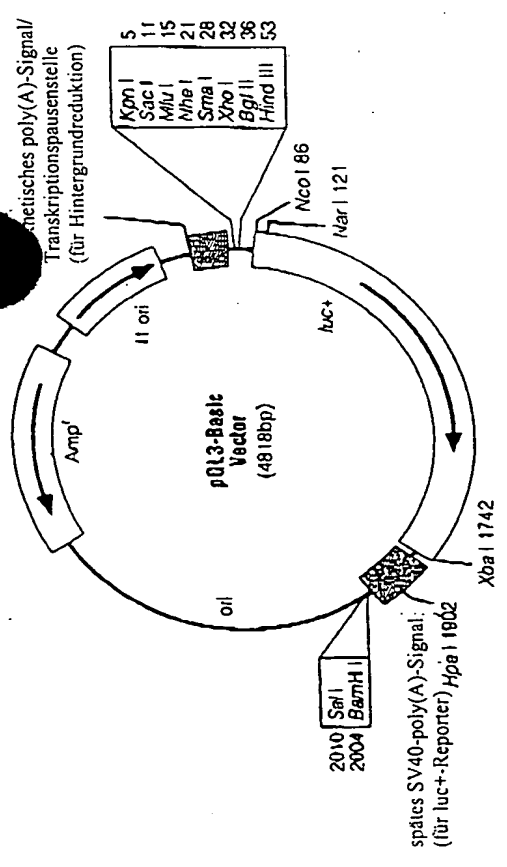
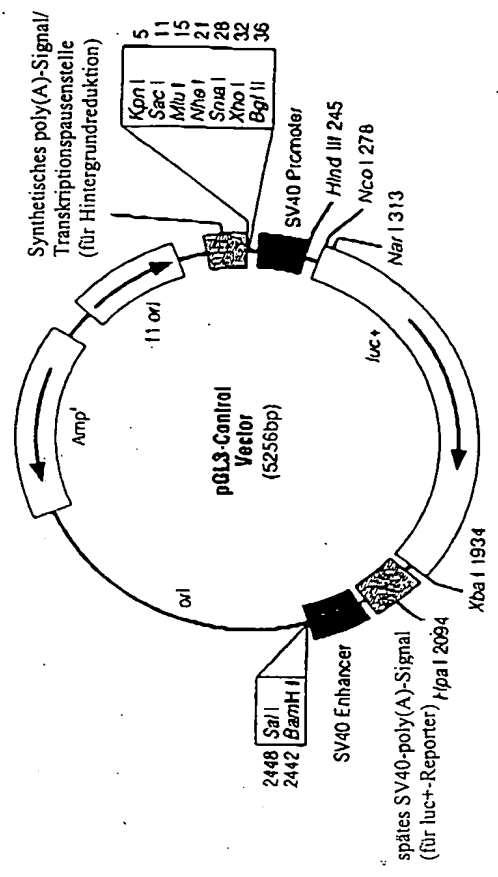
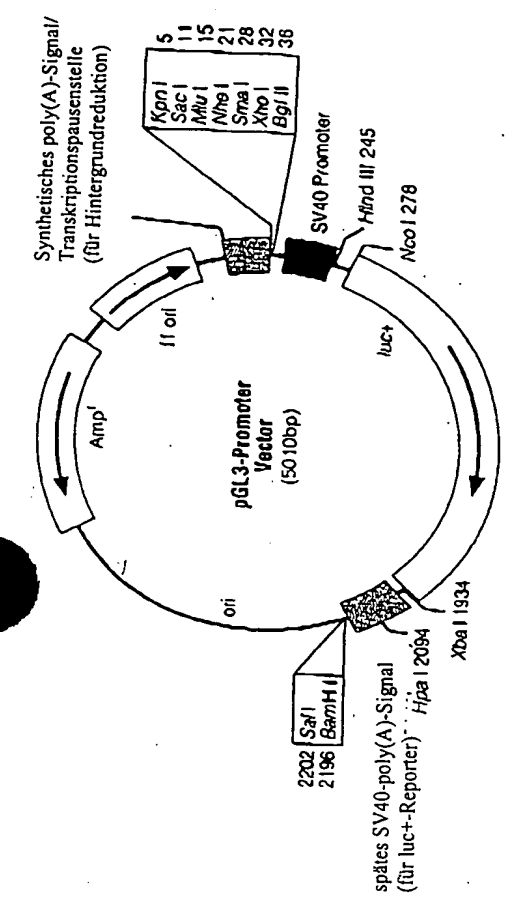


FIG. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)